

INFLUÊNCIA DO ÁLCOOL ETÍLICO NA PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS

Paula Vitória Larentis (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Graciette Matioli
(Co-orientadora), Cristiane Moriwaki de Andrade (Orientadora),
e-mail: cmoriwaki@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Farmácia /
Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

Ciência e Tecnologia de Alimentos – Ciência de Alimentos

Palavras-chave: ciclodextrinas, CGTase, álcool etílico

Resumo:

Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos com uma estrutura molecular cônica rígida com o interior hidrofóbico e o exterior hidrofílico e por essa razão, podem formar complexos de inclusão com uma ampla variedade de moléculas, resultando em alterações nas suas propriedades físicas e químicas. CGTases produzem CDs a partir de uma reação de transglicosilação intramolecular do amido. A CGTase comercializada pela empresa Novozymes (Toruzyme[®]), é uma enzima produzida por uma linhagem de *Bacillus* (hospedeiro) geneticamente modificada, que recebeu o gene para CGTase de uma linhagem de *Thermoanaerobacter* (doador). O presente projeto teve por objetivo utilizar a Toruzyme[®] para produção de CDs e otimizar o meio de produção em relação a quantidade de álcool etílico adicionado. A dosagem cromatográfica permitiu quantificar as diferentes CDs produzidas e, ao final das 24 h de reação, na presença de 15% (v/v) de álcool etílico, a enzima comercial tornou-se uma α -CGTase, pois produziu maior quantidade de α -CD, chegando a 21,62 mg/mL, enquanto para β -CD foi 17,02 mg/mL. No Brasil há uma grande motivação para o estudo de métodos de produção de CDs, já que há uma disponibilidade do substrato amido a baixo custo, o que torna atraente a perspectiva de produção de CDs, que são produtos de alto valor agregado.

Introdução

Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos contendo seis (α -CD), sete (β -CD), oito (γ -CD) ou mais unidades de glicose. Elas são produzidas a partir da reação de ciclização do amido, catalisada pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase). Esta enzima é membro da família glicosilases amilolíticas, extracelular, produzida por vários micro-organismos pertencentes ao gênero *Bacillus* (LOFTSSON e DUCHÊNE, 2007).

Para aumentar a produção de CDs, têm-se relatado o emprego de etanol, pois se acredita que ocorra uma diminuição da perda de CDs por reações de transglicosilação e acoplamento. O etanol pode facilmente ser evaporado e reutilizado, e, além disso, sua presença reduz a possibilidade de contaminações microbianas durante o processo. O etanol exclui moléculas de água do centro ativo da enzima, prevenindo reações hidrolíticas, bem como as reações reversas, e desta forma retarda a decomposição da CD formada (GAWANDE e PATKAR, 2001).

Considerando a importância da otimização de processos biotecnológicos e a necessidade de disponibilização de CDs para aplicação industrial, o presente projeto teve por objetivo utilizar a enzima comercial Toruzyme[®] para produção de CDs e otimizar as condições de produção em relação a quantidade de álcool etílico adicionado ao meio.

Materiais e métodos

Influência do álcool etílico na produção de CDs utilizando a Toruzyme[®]

A influência que concentrações moderadas de álcool etílico provocaram na produção de CDs pela CGTase de *Thermoanaerobacter* foi testada utilizando valores de 5, 10, 15 e 20% (v/v). As condições reacionais para esta produção de CDs foram: 65°C, substrato maltodextrina 10% (p/v) e 0,02% (v/v) de enzima dissolvidos em tampão citrato de sódio 10 mM, pH 6,0. O teste foi realizado durante 24 h e amostras de 2 mL foram coletadas em intervalos regulares de tempo.

Determinação espectrofotométrica de β-CD

A concentração de β-CD foi medida pela descoloração de uma solução de fenolfataleína a 550 nm, a qual ocorre depois da complexação com β-CD. A curva padrão foi preparada a partir de uma solução de β-CD 1 mM e a leitura feita em espectrofotômetro utilizando como branco água destilada.

Determinação cromatográfica de ciclodextrinas

A concentração de α-CD, β-CD e γ-CD foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) equipada com detector de índice de refração, coluna aminopropilsilano com tamanho de partícula de 10 μm, comprimento 25 cm e diâmetro interno 4,6 mm, acetonitrila e água (70:30) como fase móvel e fluxo de 0,7 mL/min à temperatura ambiente.

Resultados e Discussão

Curva padrão espectrofotométrica de β-CD

A curva padrão foi construída de acordo com a Teoria da Complexação (TARDIOLI et al., 2006) e a constante de equilíbrio $K_{\beta-CD}$ foi estimada em 18498,38 M⁻¹. Desta forma, reescrevendo a equação, obtém-se:

$$C_{\beta-CD} = 0,3 \left(1 - \frac{ABS}{ABS_0} \right) \left(1 + 1,081175 \frac{ABS_0}{ABS} \right) \quad r = 0,9992$$

Curvas padrão cromatográfica de α -CD, β -CD e γ -CD

As curvas padrão cromatográficas foram preparadas com diluições de soluções de α -, β - e γ -CD a 15 mg/mL (Fig. 1) e construídas utilizando regressão linear entre a concentração x área de cada CD.

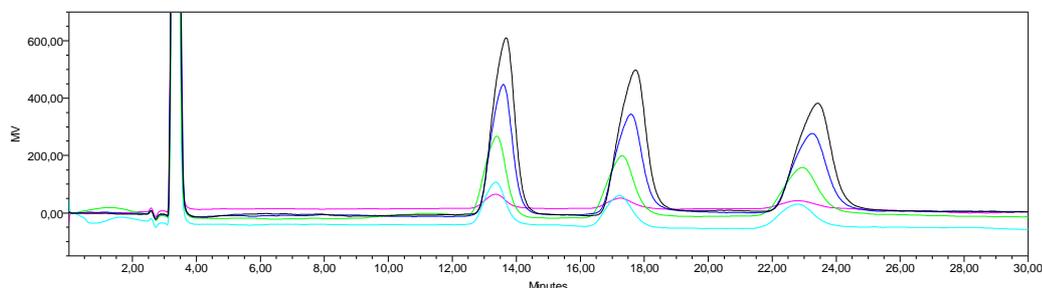


Fig. 1: Cromatogramas das soluções padrão de α -, β - e γ -CD nas concentrações de 15; 10,5; 6,3; 3,15 e 1,26 mg/mL.

Avaliação da produção de CDs pela enzima comercial Toruzyme[®] utilizando diferentes concentrações de álcool etílico

O teste foi realizado durante 24 h e amostras foram coletadas nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 360, 720 e 1440 min e imediatamente inativadas utilizando 2 mL de HCl 0,02 N e banho fervente durante 10 min para posterior dosagem espectrofotométrica e cromatográfica das CD produzidas. A dosagem espectrofotométrica mostrou que ao final das 24 h de reação, a presença de 15% (v/v) de álcool etílico proporcionou a maior produção de β -CD, chegando a 14,83 mg/mL (Fig. 2).

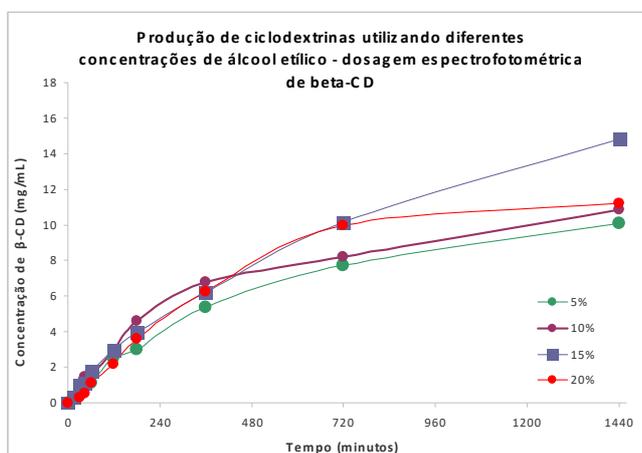


Fig. 2: Produção de ciclodextrinas utilizando 0,02% (v/v) de CGTase comercial, maltodextrina 10% (p/v), temperatura de 65°C, pH 6 e diferentes concentrações de álcool etílico. Dosagem espectrofotométrica.

A dosagem cromatográfica permitiu quantificar as diferentes CDs, e ao final das 24 h de reação, podemos afirmar que a Toruzyme[®], na presença de álcool etílico, tornou-se uma α -CGTase pois produziu maior quantidade de α -CD, chegando a 21,62 mg/mL na presença de 15% (v/v) de álcool etílico (Fig. 3).

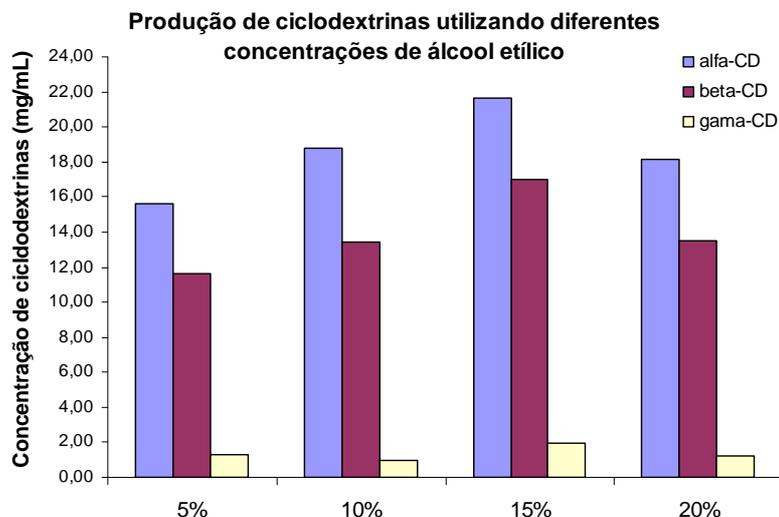


Fig. 3: Produção de ciclodextrinas utilizando 0,02% (v/v) de CGTase comercial, maltodextrina 10% (p/v), temperatura de 65°C, pH 6 e diferentes concentrações de álcool etílico ao final de 24 h. Dosagem cromatográfica.

Conclusões

Devido a maior quantidade de α -CD produzida pela enzima comercial na presença do álcool etílico em relação à produção de β -CD, a mesma tornou-se uma α -CGTase. Considerando a importância de tecnologias inovadoras na produção das CDs, agregadas ao uso de uma enzima comercial de fácil aquisição e substrato de custo reduzido, torna-se atraente a perspectiva de produção de CD no Brasil. Portanto, espera-se com esta pesquisa colaborar com uma possível produção em escala industrial de CDs no país.

Agradecimentos

À Fundação Araucária pela concessão da bolsa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos recursos recebidos por meio do Edital Universal 2014.

Referências

GAWANDE, B.; PATKAR, A. Alpha-cyclodextrin production using cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumonia* AS-22. **Starch**, v. 53, p. 75-83, 2001.

LOTTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, p.1-11, 2007.

TARDIOLI, P. W.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Characterization of *Thermoanaerobacter cyclomaltodextrin* glucanotransferase immobilized on glyoxilagarose. **Enzyme Microbial Technology**, v. 39, p. 1270-1278, 2006.